



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-241192

(43) 公開日 平成7年(1995)9月19日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 3 頁)

(21) 出願番号	特願平6-58089	(71) 出願人	000003067 ティーディーケイ株式会社 東京都中央区日本橋1丁目13番1号
(22) 出願日	平成6年(1994)3月3日	(71) 出願人	594053419 永井 良三 東京都文京区湯島4丁目8番3号 日商岩井第二本郷マンション609
		(71) 出願人	591033744 松永 是 東京都府中市幸町2-40 B506
		(74) 代理人	弁理士 岩見谷 周志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 磁性細菌マグネトソーム及び遺伝子を含有するリボソーム並びにそれを利用する細胞への遺伝子の導入方法

(57) 【要約】

【構成】 磁性細菌のマグネトソーム及び遺伝子を含有するリボソーム。該リボソームに磁場を印加することにより、該リボソームを細胞へ誘導し、該細胞と接触させる工程を有する細胞への遺伝子の導入方法。

【効果】 この磁性細菌マグネトソーム及び遺伝子を含有するリボソームは新規な物質であり、磁場の印加により目的とする細胞に高効率かつ短時間で所望の遺伝子を導入することができる。該リボソームは磁氣的に誘導することが可能であるので目的とする細胞へ選択的に遺伝子を導入することも可能である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 磁性細菌のマグネトソーム及び遺伝子を含有するリボソーム。

【請求項2】 磁性細菌のマグネトソーム及び遺伝子を含有するリボソームに磁場を印加することにより、該リボソームを細胞へ誘導し、該細胞と接触させる工程を有する細胞への遺伝子の導入方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、細胞への遺伝子導入に有用であるリボソーム及び該リボソームを利用する遺伝子導入方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 細胞への遺伝子の導入は、ヒト及び他の動物の遺伝子の機能、発現機構等の研究、遺伝子治療の研究及び遺伝子治療のために有用である。従来、かかる遺伝子導入の方法としては種々提案されているが、中でもリボソームを利用する方法が優れた方法として注目されている。その代表的なものとして、特開平2-135092号及び特開平4-108391号公報には、カチオン性脂質からなるリボソームを負に帯電する細胞膜に静電的に付着させ、該細胞膜を介して遺伝子の細胞への導入が開示されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、上記の静電的な引力を利用する方法では、細胞に遺伝子が無差別的に導入され、目的とする細胞に選択的に効率よく導入することが困難であった。また、導入処理に長時間要するなどの欠点もある。そこで、本発明の課題は、細胞に高効率かつ短時間で所望の遺伝子を導入することができ、要すれば目的とする細胞へ選択的にも遺伝子を導入することができる手段を提供することにある。

【0004】

## 【課題を解決するための手段】

リボソーム

即ち、本発明によれば、上記の課題を解決するものとして、磁性細菌のマグネトソーム及び遺伝子を含有するリボソームが提供される。本発明で使用されるマグネトソームとは、磁性細菌が菌体内に有する、寸法約500乃至1500Åの微小なマグネタイト微粒子である。同種の菌から得られるマグネトソームは寸法、形状とも非常に均一性が高く、同様のものを人工的に合成することは困難である。このようなマグネトソームを菌体内に生産する磁性細菌は例えば特開平62-61599号公報に記載の方法により淡水又は海水から容易に分離することができる。マグネトソームは通常有機被膜で覆われているが、本発明にはそのまま使用してもよいし、有機被膜を除去した状態で使用してもよい。

【0005】 リボソームに導入される遺伝子は特に限定されず、微生物、動物、植物など形質転換に使用される

遺伝子はいずれも適用可能である。また、遺伝子の形態も何ら限定されず、例えばプラスミド、DNA断片、RNA断片等挙げられる。本発明のリボソームの調製は、例えば、所要のマグネトソームと遺伝子とをリボソームを形成する脂質懸濁液に添加し、ボルテックス処理を施すことにより行うことができる。また、市販のリボソーム懸濁液にマグネトソームと遺伝子とを添加することにより調製してもよい。リボソームの調製に使用される脂質は特に限定されない。

## 【0006】 遺伝子導入方法

また、本発明によれば、上記のマグネトソーム及び遺伝子を含有するリボソームに磁場を印加することにより、該リボソームを細胞へ誘導し、該細胞と接触させる工程を有する細胞への遺伝子の導入方法が提供される。磁場の種類、印加の方法等は、磁場強度、磁場の印加によりマグネトソームを介して細胞障害が生じない範囲内であれば何ら限定されない。本発明のin vivo 及びin vitro のいずれにおいても利用することができる。例えば、in vitro の利用としては、動物細胞において一過性の遺伝子発現を研究する際に、本発明の方法を利用することによって目的とする細胞に簡単に短時間でかつ高効率で遺伝子の導入を達成することができる。

【0007】 また、in vivo の利用としては、例えば冠動脈再狭窄の遺伝子治療のために遺伝子を含む本発明のマグネトソーム含有リボソームを、磁場により冠動脈再狭窄に関与する平滑筋細胞へ誘導し該細胞と接触させることにより該細胞内へ遺伝子を導入することが考えられる。また、その他様々な疾患において経カテーテル的に遺伝子治療を行う上で有用である。

【0008】

## 【実施例】

## 実施例 1

(1) 磁性細菌AMB-1（微生物研第13282号）から分離したマグネトソームと生物発光遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子を含有するリボソームを次のようにして調製した。滅菌蒸留水中にマグネトソームとリボソームとを重量比で1/5〜5/1に混和し、15分間静置した。その後、その混合液に必要な量の遺伝子を加え、混和し15分間静置した。

【0009】 別に、プラスチック培養容器内で平滑筋細胞（ウサギ大動脈から分離、培養したもの）を5%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改良イーグル（Eagle）培地にて培養した。前記のマグネトソームとルシフェラーゼ遺伝子を含むリボソームを、このように培養した平滑筋細胞に投与し、12時間放置して反応させた。この際にプラスチック培養容器の外側面の特定の部位に直径20mmの円盤状永久磁石を貼りつけて、該磁石貼りつけ部位と、磁石を貼りつけていない部位での、平滑筋細胞へのルシフェラーゼ遺伝子の導入効率を調べた。即ち、該遺伝子を発現させて得られる生物発光を測定することにより遺伝子導

入効率を算出した。発光量は全平滑筋細胞融解産物中の総蛋白質濃度にて補正した。その結果を図1に示す。図中、MF(+)は磁石を貼りつけて磁気誘導を行った部位であり、MF(-)はかかる磁石を貼りつけていない部位での測定結果であることを示す。

#### 【0010】比較例1

コントロールとして、マグネトソームを用いず、ルシフェラーゼ遺伝子のみを含むリポソームを使用した以外は、実施例1と同様にして平滑筋細胞へのルシフェラーゼ遺伝子の導入を試みた。そして、該遺伝子の平滑筋細胞への導入効率を上記と同様にして測定した。その結果も図1に示す(注:RLV=Relative LightUnit)。図1の結果からわかるように、マグネトソームを含有しないリポソームを使用した比較例1の場合には、磁場の印加の有無にかかわらずルシフェラーゼ遺伝子の導入効率は同等であった。しかし、マグネトソームを含有するリポソームを使用した実施例1の場合には、磁場を印加すると、磁場を印加しない場合に比較して導入効率が10倍を超えて増加した。

#### 【0011】実施例2

実施例1で使用したものと同様の、マグネトソームとルシフェラーゼ遺伝子を含むリポソームを調製した。これを平滑筋細胞を実施例1と同様に培養したプラスチック培養容器に添加し反応させた。この操作を、プラスチック培養容器の底面全面に永久磁石を配置した場合と、こ

のような永久磁石を全く配置しない場合について行った。平滑筋細胞へのルシフェラーゼ遺伝子の導入効率を該遺伝子の発現から経時的に測定した。その結果を図2に示す。図中、MI(+)は磁石を用いて磁気誘導を行った場合であり、MI(-)はかかる磁気誘導を行わなかった場合である。図2の結果からわかるように、磁気誘導行われた部位ではリポソームの投与後1分でほぼ飽和に近い導入効率が達成されたが、磁気誘導を施さない部位では同等の導入効率が得られるまで60分を超える時間を要した。

#### 【0012】

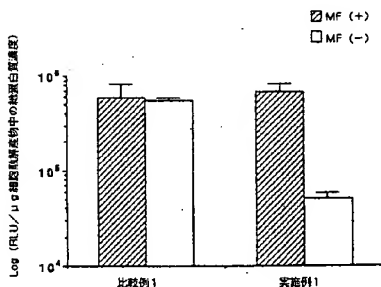
【発明の効果】本発明の磁性細菌マグネトソーム及び遺伝子を含有するリポソームは新規な物質であり、磁場の印加により目的とする細胞に高効率かつ短時間で所望の遺伝子を導入することができる。該リポソームは磁気的に誘導することが可能であるので目的とする細胞へ選択的に遺伝子を導入することも可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

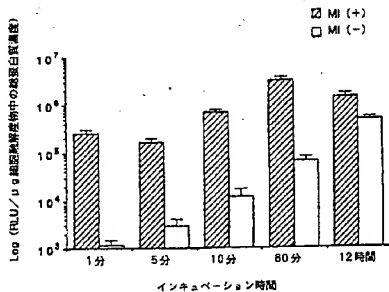
【図1】実施例1のマグネトソームを含むリポソームと比較例1のマグネトソームを含まないリポソームのそれぞれをもちいて磁気誘導が行われた部位とそうでない部位における遺伝子の導入効率を測定した結果を示す図。

【図2】実施例2で得られた、遺伝子の導入効率に対する磁気誘導の影響を経時に測定した結果を示す図。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(71)出願人 594053420

原田 光一郎  
奈良県橿原市膳夫町322

(72)発明者 原田 光一郎

奈良県橿原市膳夫町322

(72)発明者 永井 良三

東京都文京区湯島4丁目8番地3号 日商  
岩井第二本郷マンション609

(72)発明者 松永 是

東京都府中市幸町二丁目41番13号 府中第  
三住宅2-304